



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

PESQUISA NA SALIVA DE TNF-ALFA: UMA RELAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E A IDADE

Trabalho submetido por
Maria Margarida Fernandes de Carvalho
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita

e coorientado por
Doutor Vitor Tavares

Setembro de 2015

Dedicatória

Aos meus Pais,

Avós,

Amigos de longa data,

e

Amigos feitos neste percurso,

Por toda a ajuda e confiança depositada no meu trabalho e por todo o enriquecimento
para o meu desenvolvimento pessoal, a quem eu devo tudo.

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita, pela orientação, ajuda sempre presente e interesse no estudo apresentado, procurando sempre contribuir para o enriquecimento do mesmo. Agradeço ainda os ensinamentos que fizeram com que este trabalho contribuisse para o meu desenvolvimento pessoal, tendo em conta que o nível de exigência foi sempre elevado.

Ao Doutor Vitor Tavares, pela coorientação e motivação incansáveis.

À Doutora Alexandra Bernardo pelo auxílio nos procedimentos laboratoriais com empenho e muita dedicação, com interesse sempre demonstrado.

Ao Doutor Luis Proença, pelo tratamento estatístico dos dados do estudo.

À Direção Clínica da Clínica Universitária Egas Moniz, por permitir a realização deste estudo, fornecendo os meios para a concretização do mesmo.

Aos professores da Clínica Universitária Egas Moniz dos diversos departamentos, por permitirem a recolha de dados e amostras dos diversos pacientes.

Aos doentes, por tornarem este estudo possível através da sua disponibilidade e paciência.

À minha colega Ana Isabel Freitas, pela amizade ao longo destes anos e sabedoria partilhada, que me fizeram crescer a nível profissional e pessoal, tornando insubstituível a box 45. À minha colega Inês Diogo, por tudo o que passámos neste trajeto académico e pela sua presença em todos os momentos. Ao meu colega Rui Gordo, pela especial cumplicidade neste último ano e precioso contributo na elaboração deste projeto final.

A todos os meus colegas de curso que me acompanharam e apoiaram ao longo dos últimos 5 anos e cuja motivação, preocupação e amizade foram cruciais para a elaboração deste trabalho de projeto final.

Resumo

Objetivo: medir o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) na saliva humana e relacionar a concentração deste mediador inflamatório na saliva de pacientes geriátricos e não geriátricos com doença periodontal, assim como a taxa de fluxo salivar não estimulado. Esta análise poderá indicar se existe associação e qual a importância entre o processo inflamatório envolvido na doença periodontal e o processo de envelhecimento caracterizado pela alteração da resposta imunitária na população da Clínica Universitária Egas Moniz.

Materiais e Métodos: estudo observacional, analítico e transversal, efetuado numa amostra de conveniência de 50 indivíduos adultos. Foram selecionados 2 grupos: Grupo A (n=25) – doentes com periodontite com idades compreendidas entre os 25 e os 65 anos; Grupo B (n=25) – doentes com periodontite e com idade superior a 65 anos. Em cada grupo foram recolhidas amostras de saliva não-estimulada, tendo sido medidos os níveis de TNF- α na mesma, através do método ELISA. A condição clínica de doença periodontal foi aferida e confirmada por médicos dentistas assistentes da Clínica Egas Moniz. Utilizaram-se medidas de estatística descritiva e estatística inferencial com um nível de significância (α) $\leq 0,05$. A análise estatística foi efetuada com o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 21 para Windows.

Resultados: Doentes geriátricos e com periodontite apresentaram valores de TNF- α significativamente mais elevados comparativamente com os doentes não geriátricos com periodontite (31,57 vs 18,43). Os valores da taxa de fluxo salivar não estimulado foram ligeiramente inferiores nos indivíduos geriátricos com periodontite (0,47 vs 0,48), embora sem significância estatística.

Conclusões: A resposta inflamatória dos doentes com idade superior a 65 anos com doença periodontal é superior do que a mesma em indivíduos adultos mais novos.

Palavras-chave: citocinas inflamatórias, saliva, imunosenescência, doença periodontal

Abstract

Aims: measure the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in human saliva and relate the concentration of this inflammatory mediator in the saliva of both geriatric and non geriatric patients with periodontal disease, as well as non-stimulated salivary flow rate. This analysis may indicate whether there is an association and what might be the importance of the inflammatory process involved in periodontal disease and the aging process characterized by impaired immune responsiveness in the adult population of the University Clinic Egas Moniz.

Materials and Methods: observational, analytical and cross-sectional study (was) conducted on a convenience sample of 50 adults. Two groups were selected: Group A (n = 25) - patients with periodontitis aged 25 to 65; Group B (n = 25) - patients with periodontitis and over 65 (years old). In each group samples of unstimulated saliva were collected and TNF- α was measured in the same samples by the ELISA. The clinical condition of periodontal disease was measured and confirmed by attending dentists of the Egas Moniz Clinic. Measures of descriptive statistics and statistical inference with a significance level (α) ≤ 0.05 were used. Statistical analysis was performed with SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 21 for Windows.

Results: geriatric patients with periodontitis had higher TNF- α values than non-geriatric patients with periodontitis (31,57 vs 18,43) and these results were statistically significant. The values of unstimulated salivary flow rate were slightly lower in geriatric subjects with periodontitis (0,47 vs 0,48), having no statistic significance.

Conclusions: the inflammatory response of patients over 65 with periodontal disease was higher than the same in young adults.

Keywords: inflammatory cytokines, saliva, immunosenescence, periodontal disease

Índice Geral

I - Introdução	17
1. Enquadramento teórico	17
2. Hipóteses	23
II – Materiais e Métodos	25
1. Considerações éticas.....	25
2. Tipo de estudo	25
3. Local do estudo	25
4. Estudo Clínico	26
4.1 Seleção da Amostra	26
4.2 Critérios de inclusão.....	26
4.3 Critérios de exclusão.....	27
4.4 Estudo das variáveis em ambos os grupos.....	28
4.5 Observação clínica.....	28
5. Conservação das amostras de saliva estimulada recolhidas	29
6. Identificação das amostras.....	30
7. Estudo laboratorial	30
7.1 Medição dos níveis de TNF- α nas amostras recolhidas de saliva não estimulada	30
8. Base de dados para o registo.....	31
9. Análise estatística	32

III – Resultados	33
1. Caracterização da amostra	33
1.1 Caracterização dos 2 grupos da amostra.....	33
1.2 Género	33
1.3 Idade	35
1.4 TNF- α	37
1.5 Taxa de fluxo salivar não-estimulado.....	38
2. Comparação dos níveis de TNF- α em ambos os grupos da amostra.....	40
3. Comparação da taxa de fluxo salivar não-estimulado em ambos os grupos da amostra.....	41
IV – Discussão	43
V – Conclusão	49
VI - Bibliografia	51
VI – Anexos	

Índice de Figuras

Figura 1: Gráfico da frequências relativas do género.....	32
Figura 2: Diagrama de extremos e quartis relativo aos níveis de TNF- α	36
Figura 3: Diagrama de extremos e quartis relativo à taxa de fluxo salivar não estimulado	38

Índice de Tabelas

Tabela 1: Classificação da taxa de secreção salivar segundo Andrade, Paraíso, Souza, Freitas & Galvão (2007).....	29
Tabela 2: Tabela de frequências relativas e absolutas da constituição de ambos os grupos da amostra.....	33
Tabela 3: Género dos indivíduos que participaram no estudo clínico.....	34
Tabela 4: Idade dos indivíduos participantes no estudo clínico	35
Tabela 5: Estatística descritiva dos níveis de TNF- α da amostra	37
Tabela 6: Taxa de fluxo salivar não estimulado.....	39
Tabela 7: Estatística descritiva da taxa de fluxo salivar não estimulado	39

Lista de Abreviaturas

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral-alpha

IL-6 – Interleucina-6

IL-1 – Interleucina-1

IL-8 – Interleucina-8

MMPs – Metalproteinases da Matriz

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ISCSEM – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

IPC – Índice Periodontal Comunitário

PIP – Perda de Inserção Clínica

EGOHID – *European Global Oral Health Indicators Development*

I - Introdução

1. Enquadramento teórico

O objetivo deste trabalho de projeto final visa medir o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) na saliva humana e relacionar a concentração desta citocina inflamatória na saliva de pacientes geriátricos e não geriátricos com doença periodontal. Esta análise poderá indicar se existe associação e qual a importância entre o processo inflamatório envolvido na doença periodontal e o processo de envelhecimento caracterizado pela deficiente resposta imunitária característica do envelhecimento celular na população adulta da Clínica Universitária Egas Moniz. Sendo esta citocina considerada um “marcador” inflamatório da doença periodontal, o objetivo deste trabalho consiste em verificar se esta se mantém aumentada por haver doença periodontal tendo em conta que as citocinas pró-inflamatórias se encontram alteradas com o avançar da idade devido à senescência das células imunitárias. Este aumento traduz-se num maior grau de inflamação, que na população idosa se torna um fator de risco importante na manutenção da qualidade de vida destes doentes.

O número de idosos está a aumentar rapidamente a nível mundial, sendo que a expectativa de vida e a assistência com cuidados de saúde têm sido responsáveis por este crescimento (Esquenazi, 2008; Tchkonja, Zhu, van Deursen, Campisi & Kirkland, 2013; Oxford *et al.*, 2015).

À medida que a idade vai avançando existe uma grande parte da população que se depara com uma quantidade de doenças como o cancro, doença de Alzheimer, problemas cardiovasculares, obesidade, diabetes, entre outras, o que faz com que o fator idade seja considerado de risco para uma panóplia de patologias (Sikora, Arendt, Bennett & Narita, 2011; Baylis, Bartlett, Patel, & Roberts, 2013)

A idade avançada em seres humanos é considerado o maior fator de risco para uma variedade de doenças, principalmente de doenças de carácter inflamatório, aumentando a possibilidade de que abordagens feitas diretamente à “idade” diminuam o aparecimento de inúmeras causas de morbilidade na população idosa (Sikora *et al.*,

2011). O stress oxidativo, oncogénico e bacteriano (Blazkova *et al.*, 2010) têm sido descritos como indutores da senescência celular. Assim, o avançar da idade é definido como uma regressão da função fisiológica acompanhada por uma diminuição da função imunitária do indivíduo provocada muitas vezes pelo envelhecimento celular (Biagi *et al.*, 2010).

A imunossenescência é o processo complexo da desregulação imunitária associada ao envelhecimento, no qual quer a imunidade inata quer a imunidade adaptativa mostram sinais de deterioração com o avançar da idade (Boehmer, Faunce, & Kovacs, 2004). Apesar deste termo se referir mais propriamente ao envelhecimento do sistema imunitário, este envelhecimento não está necessariamente associado a uma doença mas sim a uma série de modificações morfológicas e funcionais nas células do sistema de defesa (Peres, Nardi & Chies, 2003). Nos seres humanos, principalmente nos idosos com este tipo de imunidade comprometida pela idade, existe um aumento da susceptibilidade às infecções virais e bacterianas, reativação de vírus latentes, e diminuição da resposta às vacinas (Boehmer *et al.*, 2004). Estes relatos podem decorrer da redução do número de monócitos e macrófagos circulantes, também característica do processo de envelhecimento, da qual resulta o prejuízo na apresentação de antígenos (Kinoshita, 2014).

O envelhecimento celular, também denominado imunosenescência, pode ser ainda explicado pelo uso sistemático de células imunitárias, designadamente dos linfócitos T. Estes, quando expostos a múltiplos antígenos, e com o fim de os eliminar, evoluem no sentido de formar linfócitos específicos para cada antígeno. Depois de concluída a tarefa, a maioria destes linfócitos antígeno-específicos sofrem apoptose, mas uma parte destes é convertida em células de memória específicas para futuras invasões pelo mesmo antígeno (Vallejo, Weyand & Goronzy, 2004). A consecutiva invasão pelo mesmo agente provoca a diminuição do número de células T virgens e o aumento de células T de memória, fator que com a idade se acredita ser uma consequência da involução tímica em combinação com diferenciação contínua de células T virgens em células T de memória. A perda significativa de células T virgens aliada à idade foi também relatada nos restantes tecidos linfóides, sendo o timo o principal órgão afetado, uma vez que este apresenta uma regressão à medida que o processo de envelhecimento vai decorrendo caracterizada pela redução do seu tamanho e pela sua substituição por tecido adiposo (Frasca & Blomberg, 2011; Peres *et al.*, 2003).

A situação que resulta da acumulação de células T de memória em indivíduos idosos promove assim a diminuição da diversidade de especificidades presentes no repertório de células T virgens, dando origem à restrição de novas especificidades de reconhecimento, que interferem no processo da resposta imunitária a novos antígenos. Por conseguinte, a formação e expansão dessas células T-específicas seguida de apoptose determina a eficiência do sistema imunitário. Tendo em conta que as células T têm uma produção limitada, a sua ativação crónica provocada por uma inflamação persistente pode levar à emergência de células senescentes prematuras que promovem o desenvolvimento de certas patologias assim como das suas manifestações clínicas (Vallejo *et al.*, 2004; Rajendran, Priyadharshini & Arora, 2013; Kinoshita, 2014).

Na população idosa, o sistema de defesa apresenta sinais de envelhecimento e esse compromisso imunitário é reconhecido no aumento da susceptibilidade a infeções virais e bacterianas (Boehmer *et al.*, 2011; Frasca & Blomberg, 2015) indicadores estes com grande impacto na manutenção da saúde uma vez que são promotores de incapacidade e de mortalidade (Frasca *et al.*, 2015).

O fenótipo do envelhecimento é explicado por um desequilíbrio entre os processos inflamatório e anti-inflamatório, o que resulta num estado pró-inflamatório crónico que é chamado de *inflammaging* (Franceschi *et al.*, 2007; Brito *et al.*, 2011). A acumulação de células senescentes pode contribuir, pelo menos em parte, para a formação de danos nos tecidos e para a inflamação constante no fenótipo do envelhecimento (Sikora *et al.*, 2011).

Nos idosos são relatadas patologias como a aterosclerose, depressão e outras doenças de carácter inflamatório como a diabetes, doenças estas que apresentam valores elevados de IL-6 e de TNF- α , componentes que são representativos e mediadores da resposta inflamatória (Tchkonia *et al.*, 2013).

Os macrófagos produzem TNF- α e IL-6, duas das principais citocinas pró-inflamatórias. Estas citocinas pleiotrópicas estimulam respostas imunocelulares e induzem a produção de proteínas de fase aguda para respostas inflamatórias sistémicas (Boehmer *et al.*, 2004), como é o caso da doença periodontal (Taylor, 2014).

É necessário ter em consideração que a cavidade oral do idoso apresenta uma elevada incidência de cárie e de lesões periodontais, existindo um elevado risco de desenvolverem outras patologias de outros órgãos e sistemas (Castro, Alves & Lopes, 2010), da mesma forma que o fato de existir doença periodontal pode piorar bastante o estado de determinadas patologias já existentes como é o caso da cardiopatia isquêmica. Indivíduos com doença periodontal têm um maior risco de desenvolverem doenças cardiovasculares, quando comparados com indivíduos sem doença periodontal (Castro *et al.*, 2010).

A doença periodontal distingue-se de outras infecções por não ser causada por um só microrganismo mas por um vasto número destes (Kinney, Ramseier & Giannobile, 2007) propagando-se através de uma interação complexa entre os elementos periopatogénicos e o mecanismo de defesa do hospedeiro (AlMoharib *et al.*, 2014). Inicia-se com uma infecção microbiana que acontece após a colonização do sulco gengival por microrganismos periodontais. Estes, estimulando o epitélio gengival promovem a produção de mediadores inflamatórios como é o caso das citocinas. Este processo resulta na migração de infiltrado neutrófilo do epitélio juncional para o sulco gengival (Borges *et al.*, 2007; Leishman, Seymour, & Ford, 2013). Estão assim criadas as condições que resultam na perda das fibras de colagénio e da sua íntima relação com a superfície do cimento, na migração apical do epitélio juncional, na recessão óssea e gengival e finalmente na perda de todo o tecido que suporta os dentes (Kinney *et al.*, 2007; Noh *et al.*, 2013).

As reações imunológicas e inflamatórias provocadas pelo biofilme e pela placa bacteriana são os principais mecanismos que resultam na doença periodontal. Esta doença tem uma prevalência mundial bastante considerável e representa a maior causa de destruição dos tecidos de suporte das peças dentárias mediada pela hiperactividade leucocitária e geração de citocinas (AlMoharib *et al.*, 2014) com consequente perda dentária (Borges *et al.*, 2007). É caracterizada como uma patologia inflamatória crónica induzida maioritariamente por bactérias anaeróbias gram negativas tais como *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, num vasto role de mais de 600 bactérias diferentes capazes de colonizar a cavidade oral (Kinney *et al.*, 2007).

A diminuição da mastigação e consequente digestão deficiente, aliadas à diminuição do número das papilas gustativas e à polimedicação frequente no idoso que geralmente tem associação com a redução do fluxo salivar, influencia diretamente o estado nutricional, físico e psicológico do indivíduo (Castro *et al.*, 2010).

Mudanças anatômicas e funcionais dos tecidos periodontais também têm sido descritos como associados ao processo de envelhecimento, como a diminuição da quantidade de queratina e da espessura do epitélio gengival (Castro *et al.*, 2010).

As citocinas presentes na saliva e no fluido crevicular mostraram-se mediadores da resposta imunológica do hospedeiro a antígenos exógenos, uma vez que têm sido encontradas em altas concentrações no fluido crevicular de pacientes com doença periodontal (Gokul, Faizuddin & Pradeep, 2012). Estes mediadores inflamatórios podem ser pesquisados na saliva, sendo usados como meio para avaliar qualitativa e quantitativamente certas doenças, contribuindo para o seu diagnóstico e caracterização (Kinney *et al.*, 2011b).

Um número de mediadores inflamatórios, como interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , prostaglandinas e metalproteinases da matriz (MMPs) estão envolvidos na doença periodontal afetando a atividade leucocitária, osteoblástica e osteoclástica, e promovendo uma cascata de eventos que resultam num processo de remodelação dos tecidos local e sistemicamente (Noh *et al.*, 2013). Estas células inflamatórias do hospedeiro, quando recrutadas, são libertadas pelos fibroblastos, pelos macrófagos, do tecido conjuntivo e das células epiteliais de união, ou juncionais e vão atuar de forma desordenada destruindo os tecidos gengivais e intensificando a reabsorção óssea (Silveira & Alves, 2009).

O TNF- α , que é secretado maioritariamente por monócitos e macrófagos, é uma potente citocina inflamatória que promove a libertação de outros elementos reguladores como é o caso das colagenases (MMPs), levando à destruição do colagénio e à reabsorção óssea, podendo ser considerada uma citocina *major* envolvida na patogenia da doença periodontal (Noh *et al.*, 2013). Tem sido sugerido que o TNF- α possa servir como marcador de atividade inflamatória e assim possa também ter um papel primordial no

diagnóstico e prognóstico para a monitorização da doença periodontal e para a decisão terapêutica (Noh *et al.*, 2013).

Os macrófagos são importantes produtores de mediadores inflamatórios responsáveis por variadas sinalizações e ligações com outras células do sistema imunitário como o recrutamento de neutrófilos e a indução da proliferação de linfócitos T (Kinoshita, 2014).

Na doença periodontal destaca-se a elevada concentração do componente inflamatório TNF- α , que tem sido descrita como sendo maior em pacientes com doença periodontal relativamente aos pacientes sem doença periodontal e que os níveis deste mediador inflamatório baixam aquando da aplicação da terapêutica periodontal (Sexton Wm *et al.*, 2011; Suvan, D’Aiuto, Moles, Petrie & Donos, 2011).

Na periodontite crónica, é importante ter em consideração a falta de consistência no que diz respeito à sua caracterização imunológica tem sido atribuída à complexidade da patogénese da mesma. O rigor no seu diagnóstico e a dificuldade na determinação do seu estado de atividade em qualquer período de tempo usando os métodos de diagnóstico convencionais são os principais promotores desta complexidade (Prakasam & Srinivasan, 2014).

Este trabalho visa medir o TNF- α na saliva humana e relacionar a concentração desta citocina inflamatória na saliva de pacientes idosos com doença periodontal, comparando os mesmos parâmetros de pacientes adultos não idosos, assim como comparar o fluxo salivar entre os dois grupos. Esta análise quantitativa poderá indicar se existe associação e qual a importância entre o processo inflamatório envolvido na doença periodontal e o processo de envelhecimento caracterizado pela resposta imunitária senescente.

Serão recolhidas amostras de saliva não-estimulada de uma população de 50 doentes da Clínica Universitária Egas Moniz, que serão submetidas ao Teste ELISA para medição do mediador inflamatório TNF- α presente nas amostras.

2. Hipóteses

- Existe alteração no doseamento do TNF- α na saliva na doença periodontal;
- Existe alteração no doseamento do TNF- α na saliva de pacientes geriátricos do que de pacientes não geriátricos;
- Existe diferença no fluxo salivar entre os dois grupos estudados (geriátricos e não geriátricos).

II – Materiais e Métodos

1. Considerações éticas

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética da Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, tendo sido aprovado.

Os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Informado, tendo sido informados e esclarecidos acerca dos objetivos do mesmo. As amostras foram recolhidas e os dados utilizados exclusivamente para análise estatística, mantendo-se a confidencialidade e anonimato.

2. Tipo de estudo

Foi realizado um estudo observacional, analítico e transversal para medir: a) concentração da citocina inflamatória TNF- α que se encontra presente nas amostras de saliva humana; b) taxa de fluxo salivar.

3. Local do estudo

O estudo decorreu na Clínica Universitária Egas Moniz e no laboratório BioquiLab – laboratório de bioquímica do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

O estudo clínico teve início com a recolha de dados clínicos e amostras de saliva não estimulada, dando então seguimento ao trabalho laboratorial realizado no BioquiLab (medição dos mediadores inflamatórios TNF- α na saliva não-estimulada).

4. Estudo Clínico

4.1 Seleção da Amostra

A amostra foi constituída por 50 doentes da Clínica Universitária Egas Moniz, distribuídos em 2 grupos:

- Grupo A (n=25) – doentes com Periodontite com idades compreendidas entre os 25 e os 65 anos (não geriátricos);
- Grupo B (n=25) – doentes com Periodontite com idade superior a 65 anos (geriátricos).

Em todos os doentes, foi feita a recolha de saliva não estimulada e medida a taxa de fluxo salivar.

Quanto à condição periodontal, esta já tinha sido auferida e confirmada previamente ao estudo por Médicos Dentistas Docentes especializados na área da Periodontologia, tendo sido considerados doentes periodontais aqueles que apresentavam bolsas periodontais em que haveria necessidade de recorrer a tratamento periodontal.

4.2 Critérios de inclusão

Foram incluídos indivíduos que tivessem os seguintes critérios comuns: a) doentes da Clínica Universitária Egas Moniz; b) sexo Masculino e Feminino; c) doentes que assinassem o termo de consentimento informado; d) doentes com mais de 25 anos.

Os critérios de inclusão específicos para cada grupo da amostra foram os seguintes:

- Grupo A – Não Geriátricos com Periodontite
 - Todos os indivíduos com idade entre os 25 e os 65 anos e simultaneamente com bolsas periodontais > 4 mm de profundidade
- Grupo B – Geriátricos com Periodontite
 - Todos os indivíduos com idade superior a 65 anos e simultaneamente com bolsas periodontais > 4 mm de profundidade

4.3 Critérios de exclusão

Foram definidos critérios de exclusão específicos para cada grupo da amostra:

Grupo A – Não Geriátricos com Periodontite

- Doença sistêmica - inclui hipossialia, doença metabólica óssea, auto-imune e diabetes (de Araújo Navas *et al.*, 2012);
- Desdentado total (Chopra, Gupta, Lakhanpal, Rao & Vashisth, 2013);
- Doença oncológica (Arias *et al.*, 2006);
- Gravidez (de Araújo Navas *et al.*, 2012);
- Lactante (Kinney *et al.*, 2011);
- Fumadores (De Araújo Navas *et al.*, 2012);
- Indivíduos em terapêutica antibiótica por razões médicas ou dentárias nos últimos 3 meses (Kinney *et al.*, 2011);
- Indivíduos com idade superior a 65 anos (Clerencia-Sierra *et al.*, 2015).

Grupo B – Geriátricos com Periodontite

- Doença sistêmica - inclui hipossialia, doença metabólica óssea, auto-imune e diabetes (de Araújo Navas *et al.*, 2012);
- Desdentado total (Chopra *et al.*, 2013);
- Doença oncológica (Arias *et al.*, 2006);
- Fumadores (De Araújo Navas *et al.*, 2012);

- Indivíduos em terapêutica antibiótica por razões médicas ou dentárias nos últimos 3 meses (Kinney *et al.*, 2011);
- Idade inferior a 65 anos (Ahmed, Nanji, Mujeeb, & Patel, 2014).

4.4 Estudo das variáveis em ambos os grupos

Foram estudadas as seguintes variáveis:

- Idade
- Nível de TNF- α na saliva não estimulada
- Taxa de fluxo salivar não estimulado

4.5 Observação clínica

A nível clínico foi examinada a taxa de fluxo salivar não estimulado, uma vez que o diagnóstico de Periodontite já tinha sido realizado anteriormente.

4.5.1 Determinação da taxa de fluxo salivar não estimulado (em ambos os grupos)

A saliva foi recolhida num tubo graduado de Falcon entre as 11h e as 20h, durante 5 minutos cronometrados, uma vez que os resultados são expressos em ml/min. Foi explicado ao doente que deveria repousar a língua na face palatina dos incisivos superiores, deixando cair a saliva de forma passiva, em posição mais estática possível com a cabeça ligeiramente inclinada para a frente. Esta taxa foi determinada no dia da medição imunológica com mais rigor, com recurso a um pompete e a pipetas de 10 ml.

A determinação da taxa de fluxo salivar não estimulada foi realizada em ambos os grupos da amostra com o objetivo de se verificar se os doentes apresentavam hipossialia, que foi um dos fatores de exclusão comum aos dois grupos; assim como avaliar se existiam diferenças significativas na taxa de fluxo salivar entre os mesmos.

Tabela 1: Classificação da taxa de secreção salivar segundo Andrade, Paraíso, Souza, Freitas & Galvão (2007)

Taxa de secreção normal	0.25-0.35ml/min
Taxa de secreção baixa	0.1-0.25ml/min

5. Conservação das amostras de saliva estimulada recolhidas

Após a recolha das amostras de saliva não estimulada em tubos de Falcon graduados, cada uma delas era congelada a uma temperatura de -80°C até ser realizada a análise imunológica. À medida que eram recolhidas as amostras, estas eram identificadas no momento da colheita de forma inequívoca, tendo sido rotuladas e tratadas de forma a respeitar o direito de privacidade do dador de acordo com a lei n.º12/2005, publicado no Diário da República. Para garantir a separação de dados pessoais e clínicos e rastreabilidade da amostra, cada tubo foi rotulado com uma identificação que posteriormente gerou um código com o número de identificação (Normalizado, 2011).

A análise da citocina inflamatória (TNF- α) presente nas amostras de saliva foi realizada através do equipamento Immulite, da Siemens.

6. Identificação das amostras

As amostras foram identificadas por letras, correspondendo ao grupo de doentes a que pertencia a amostra e com números, do 1 até ao 25 em cada grupo. Assim:

- Grupo A (Não Geriátricos com Periodontite): de 1 até 25;
- Grupo B (Geriátricos com Periodontite): de 1 até 25.

7. Estudo laboratorial

7.1 Medição dos níveis de TNF- α nas amostras recolhidas de saliva não estimulada

No dia anterior ao dia da medição imunológica procedeu-se à descongelação das amostras. As mesmas foram pipetadas e posteriormente analisadas pelo equipamento IMMULITE da Siemens, que permite a realização de imunoensaios através de quimioluminescência automatizados, sendo que através do recurso a kits específicos, quantifica os valores de TNF- α presentes nessas amostras. Este equipamento recorre a ensaios específicos através de pérolas de poliestireno que são recobertas por um reagente marcado com fosfatase alcalina, um substrato quimioluminescente e um antigénio ou anticorpo que corresponde a uma fase sólida e que se encontra alojado num dispositivo plástico sólido, denominado unidade teste. O sistema Immulite automatiza o processo de ensaio, sendo que o operador apenas participa na fase inicial, que consiste na transferência das amostras para as unidades de teste e colocá-las na plataforma de carga.

Protocolo laboratorial:

1º passo – Pipetaram-se as amostras de saliva, uma a uma, para um tubo codificado por códigos de barras, sendo estes designados unidades de teste;

2º passo – Transferiram-se as unidades de teste para os dispositivos de incubação principal;

3º passo – Adicionaram-se os reagentes correspondentes aos kits utilizados;

4º passo – O primeiro tubo apresentava substrato, sendo considerado o tubo controlo que iria calibrar o ensaio para medição dos níveis de TNF- α (pertencente ao kit TNF- α);

5º passo – Premiu-se a tecla Go do painel de controlo do Immulite, iniciando-se a leitura do código de barras das unidades de teste;

6º passo – Iniciou-se a incubação durante cerca de 30 a 60 minutos;

7º passo – As unidades de teste sofreram processos de centrifugação e lavagem;

8º passo – Houve um novo processo de incubação, tendo este sido mais curto;

9º passo – Os valores de TNF- α de cada amostra foram expressos em pg/ml, tendo sido registados numa folha de laboratório e posteriormente introduzidos no Programa Microsoft Excel para o seu registo, avaliação e posterior análise estatística. Estes registos foram ainda guardados numa base de dados pertencente ao BioquiLab do ISCSEM.

8. Base de dados para o registo

Os dados clínicos e laboratoriais, que foram sendo recolhidos foram introduzidos e codificados no Programa Microsoft Excel, para que fosse possível uma posterior análise estatística recorrendo ao Programa informático SPSS®.

9. Análise estatística

A análise estatística envolveu a utilização de medidas de estatística descritiva (frequências absolutas e relativas, médias e desvios padrão). Nesta utilizou-se um nível de significância ($\alpha \leq 0,05$) como referência para aceitar ou rejeitar a hipótese nula.

Nestas hipóteses, em que se compararam dois grupos, utilizou-se o teste t de Student.

A análise estatística foi efectuada com o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 21 para Windows.

III – Resultados

1. Caracterização da amostra

1.1 Caracterização dos 2 grupos da amostra

Os indivíduos encontraram-se distribuídos por 2 grupos, sendo que ambos tinham uma característica comum: doentes com Periodontite. A característica que os distinguia era o factor idade: não geriátricos e geriátricos. A distribuição dos doentes por cada grupo era homogénea (50,0%, n = 25).

Tabela 2: Tabela de frequências relativas e absolutas da constituição de ambos os grupos da amostra

	Frequência	Percentagem
Não Geriátricos com Periodontite	25	50,0
Geriátricos com Periodontite	25	50,0
Total	50	100,0

1.2 Género

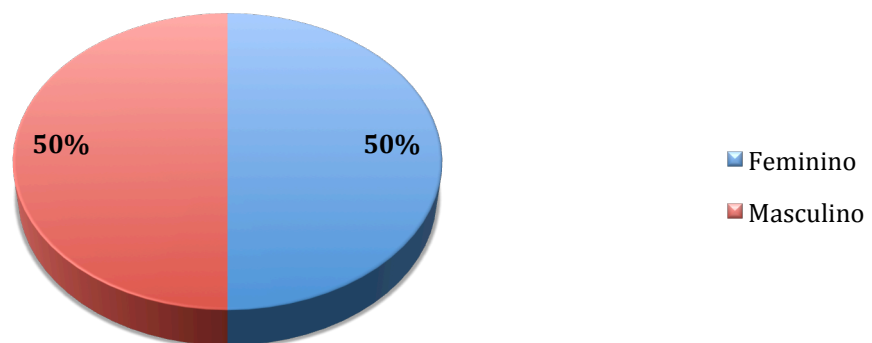
Análise de dados: Neste estudo colaboraram na investigação 50 indivíduos. Coincidentemente quer os indivíduos do sexo masculino e quer os indivíduos do sexo

feminino encontraram-se representados pelo mesmo número de doentes (50,0%, n = 25; 50,0%, n = 25).

Tabela 3: Género dos indivíduos que participaram no estudo clínico

Género	Frequência	Percentagem
Feminino	25	50,0
Masculino	25	50,0
Total	50	100,0

Figura 1: Gráfico da frequências relativas do género



1.3 Idade

Análise de dados: Neste estudo, foram avaliados 50 indivíduos. A média de idades da amostra total foi de 60,82 anos ($dp=15,36$). As idades oscilaram entre os 27 anos, como idade mais baixa e os 87 anos, o que representou uma amplitude de idades de 60 anos.

Tabela 4: Idade dos indivíduos participantes no estudo clínico

Idade	Frequência	Porcentagem	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
27	1	2	60,82	15,36	27	87
34	1	2				
37	2	4				
41	1	2				
43	4	8				
45	3	6				
46	1	2				
50	2	4				
51	1	2				
52	1	2				
54	2	4				

56	1	2
57	2	4
59	1	2
63	2	4
66	2	4
67	3	6
68	1	2
70	3	6
71	1	2
72	3	6
73	1	2
74	1	2
76	2	4
78	1	2
79	1	2
80	1	2
81	2	4
83	2	4

87	1	2
Total	50	100

1.4 TNF- α

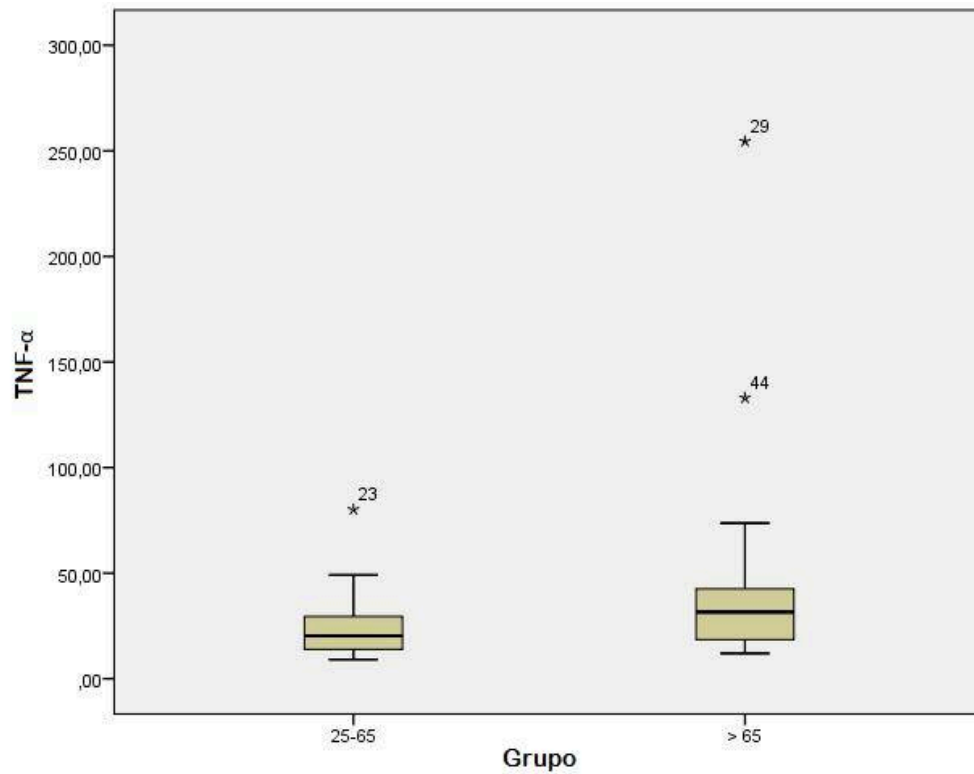
Análise de dados: A estatística descritiva da variável TNF- α no dois grupos pode ser visualizada na tabela que se segue. Nela estão indicados os valores mínimo e máximo, média e o seu desvio-padrão.

Tabela 5: Estatística descritiva dos níveis de TNF- α da amostra

TNF- α		
Grupo	A	B
N	25	25
Média	24,16	44,54
Desvio-padrão	16,07	50,60
Mínimo	9,1	12
Máximo	80,15	254,5

Na figura seguinte podemos apreciar os valores de TNF- α em cada grupo. Nos grupos A e B identificamos 3 observações que podem ser consideradas outliers no que respeita aos níveis de TNF- α .

Figura 2: Diagrama de extremos e quartis relativo aos níveis de TNF- α



1.5 Taxa de fluxo salivar não-estimulado

Análise de dados: Dos 50 doentes que respeitaram os critérios de inclusão do estudo, todos eles apresentaram uma taxa de fluxo salivar não-estimulado normal.

Tabela 6: Taxa de fluxo salivar não estimulado

	Frequência	Porcentagem	Média	Desvio padrão
>0.35ml/min	50	100	0,52	0,25

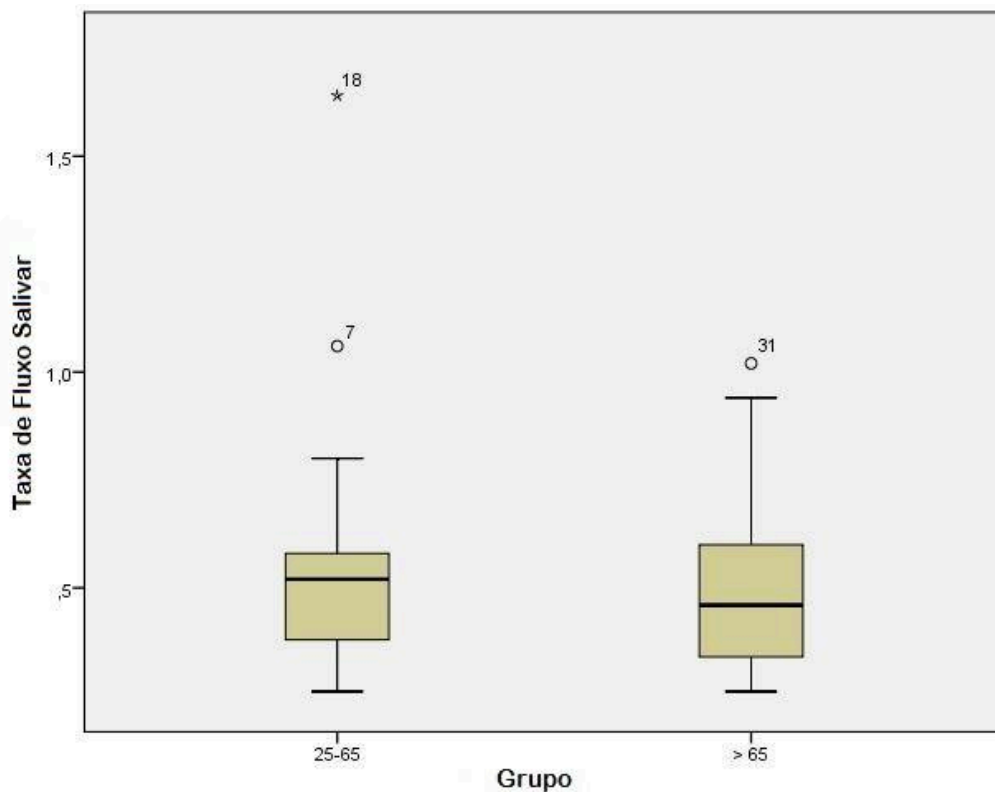
A estatística descritiva da variável taxa de fluxo salivar não-estimulado no dois grupos pode ser visualizada na tabela que se segue. Nela indicamos os seus valores mínimo (0,26 em ambos) e máximo (1,64 para o grupo A e 1,02 para o grupo B), média (0,54 para o grupo A e 0,49 para o grupo B) e o seu desvio-padrão (0,28 vs 0,22).

Tabela 7: Estatística descritiva da taxa de fluxo salivar não estimulado

Taxa de fluxo salivar não estimulado		
Grupo	A	B
N	25	25
Média	0,54	0,49
Desvio-padrão	0,28	0,22
Mínimo	0,26	0,26
Máximo	1,64	1,02

Na figura seguinte podemos apreciar os valores da taxa de fluxo salivar não-estimulado em cada grupo. Nos grupos A e B identificamos 3 observações que podem ser consideradas outliers no que respeita aos níveis da taxa de fluxo salivar não-estimulado.

Figura 3: Diagrama de extremos e quartis relativo à taxa de fluxo salivar não estimulado



2. Comparação dos níveis de TNF- α em ambos os grupos da amostra

Para testar a variância existente nos níveis de TNF- α , tendo em conta a idade, foi usado o teste t-student, para verificar se as médias dos níveis de TNF- α dos doentes não geriátricos com Periodontite e geriátricos com Periodontite diferem significativamente para um nível de significância de 0,05 (5%).

O teste t-student revela uma diferença estatisticamente relevante entre o valor médio dos níveis de TNF- α encontrados nos indivíduos não geriátricos com Periodontite ($M = 18,43$, $dp = 6,88$) e os indivíduos geriátricos com Periodontite ($M = 31,57$, $dp = 16,05$), com uma significância de 0,01 ($p = 0,01 < 0,05$), pelo que se rejeita a hipótese nula. O significado da rejeição da hipótese nula consiste na existência de evidências estatísticas suficientes para afirmar que a diferença das médias é significativamente diferente de zero para um nível de significância de 5%. Assim é possível afirmar com 95% de

confiança que existe diferença significativa entre os níveis de TNF- α dos doentes não geriátricos com Periodontite e geriátricos com Periodontite, sendo que os últimos apresentam um número significativamente maior.

3. Comparação da taxa de fluxo salivar não-estimulado em ambos os grupos da amostra

Para testar a variância existente nas taxas de fluxo salivar não-estimulado, tendo em conta a idade, foi usado também o teste t-student, para verificar se as médias das taxas de fluxo salivar não-estimulado dos doentes não geriátricos com Periodontite e geriátricos com Periodontite diferem significativamente para um nível de significância de 0,05 (5%).

O teste t-student não revela uma diferença estatisticamente relevante entre o valor médio das taxas de fluxo salivar não-estimulado encontrado nos indivíduos não geriátricos com Periodontite ($M = 0,48$, $dp = 0,12$) e os indivíduos geriátricos com Periodontite ($M = 0,47$, $dp = 0,19$), com uma significância de 0,89 ($p = 0,89 > 0,05$), pelo que não se rejeita a hipótese nula. O significado de não se poder rejeitar a hipótese nula consiste na inexistência de evidências estatísticas suficientes para afirmar que a diferença das médias é significativamente diferente de zero para um nível de significância de 5%. Assim, apesar de o valor da média para os indivíduos não geriátricos com Periodontite ser ligeiramente maior, não apresenta uma diferença estatisticamente significativa.

IV – Discussão

A avaliação salivar e a quantificação de biomarcadores salivares contribui não só para diagnóstico de doenças da cavidade oral mas também para o diagnóstico de condições sistêmicas (Szczeklik, Owczarek, Pytko-Polończyk, & Kęsek, 2012).

A secreção salivar pode refletir a severidade de doenças sistêmicas (Szczeklik *et al.*, 2012), tendo a recolha de saliva e a sua avaliação vantagens relativamente à análise através da recolha de sangue (Desai, 2014).

As citocinas pró-inflamatórias foram reveladas como marcadores sistêmicos sensíveis e preditivos de condições sistêmicas futuras em indivíduos aparentemente saudáveis (Gornowicz *et al.*, 2012).

Os níveis salivares da citocina pró-inflamatória TNF- α apresentam-se muito elevados nos indivíduos com doença periodontal relativamente aos indivíduos saudáveis em variados estudos, encontrando-se estes valores também relacionados com o grau de severidade da doença (Sexton *et al.*, 2011; Gümüş, Nizam, Lappin, & Buduneli, 2014).

Uma preocupação do uso clínico de marcadores salivares como meio de diagnóstico da doença periodontal é a possibilidade de que a inflamação sistémica demonstrada pelo aumento dos níveis destes mediadores da resposta inflamatória resulte de outras doenças crónicas inflamatórias existentes, confundindo e pondo em causa a utilidade de biomarcadores (Mirrielees *et al.*, 2010).

A quantidade de citocinas pró-inflamatórias é superior nos tecidos gengivais de indivíduos com inflamação periodontal, o que contribui diretamente para um estado sistémico de hiper inflamação, tornando-se esta condição um risco para outras doenças sistêmicas (Gornowicz *et al.*, 2012).

Pode dizer-se que o aumento da severidade da doença periodontal com o avançar da idade é o resultado do efeito cumulativo da exposição prolongada ao desafio bacteriano (Rajendran *et al.*, 2013).

O envelhecimento celular denominado de imunosenescência caracterizado pela diminuição da função imunológica do indivíduo (Oxford *et al.*, 2015) promove a redução da eficácia do sistema imunitário e aumenta a susceptibilidade do desenvolvimento de patologias como consequência da inflamação persistente (Baylis *et al.*, 2013). Alguns autores definem imunosenescência como um processo de remodelação onde alguns parâmetros aumentam e outros diminuem com a idade, pelo que se destaca o aumento da atividade inflamatória basal definido como *inflammaging* (Brito *et al.*, 2011).

De acordo com a teoria do *inflammaging*, o processo de envelhecimento é constituído por uma remodelação crónica provocada por stress oxidativo e inflamatório que leva à danificação dos componentes celulares, nos quais estão incluídas proteínas e ADN, contribuindo assim para o declínio das funções fisiológicas próprias da idade (Vel Szic, Declerck, Vidaković & Vanden Berghe, 2015).

O estudo feito em 2014 por Kinoshita refere que apesar de não haver redução do número de neutrófilos no processo de envelhecimento, existe uma diminuição da atividade dessas células. Esta alteração imunológica é caracterizada pela diminuição da atividade quimiotáctica, o que resulta no atraso da chegada dos neutrófilos ao local da infeção e consequentemente maior proliferação do agente infeccioso (Kinoshita, 2014).

Foi demonstrado que existe um defeito na apresentação antigénica em indivíduos idosos, o que leva à redução da proliferação de linfócitos T e portanto à diminuição da produção de citocinas (Esquenazi, 2008). Estas evidências não se encontram de acordo com os resultados obtidos neste estudo, já que se verificou uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,01$) entre os dois grupos estudados, na qual o valor dos níveis de TNF- α no grupo não geriátrico com Periodontite é muito superior (31,57 vs 18,43).

Segundo Rathnayake *et al* (2013b), o critério “idade” não apresentou correlação com os níveis dos mediadores inflamatórios no grupo de doentes com periodontite, considerando substâncias como as citocinas irrelevantes no processo de envelhecimento.

Contrariamente, existem estudos que relatam o aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 com o envelhecer (Jylha, Paavilainen, Lehtima, & Goebeler, 2007; Silva *et al.*, 2010).

Está relatado que a inflamação promove diretamente a acumulação e o aumento da carga de doença instalada, independentemente da idade, o que sugere a possibilidade de que a inflamação sistêmica associada a doenças crônicas possa contribuir diretamente para a aceleração e propagação do envelhecimento celular observado em indivíduos com doenças de carga severa (Stepanova, Rodriguez, Biredinc, & Baranova, 2014). Existem evidências de que o envelhecimento humano é acompanhado pela elevação dos níveis séricos de mediadores inflamatórios distintos, o que promove o desenvolvimento de doenças consideradas como típicas do envelhecimento (Brito *et al.*, 2011).

Golpasand Hagh, Zakavi, Hajizadeh, & Saleki (2014) provaram a existência de uma relação entre a doença periodontal e a hiperlipidemia, pelo que os níveis de colesterol em indivíduos com periodontite foram significativamente superiores quando comparados com indivíduos sem doença periodontal. Tendo em conta que a doença periodontal pode agravar o estado de doenças sistêmicas existentes (Mawardi, Elbadawi, & Sonis, 2015), a terapêutica periodontal é importante em doentes idosos com aterosclerose (Golpasand Hagh *et al.*, 2014).

Uma das limitações deste estudo foi não ter sido feito a avaliação da saúde periodontal e não se ter quantificado a gravidade da doença periodontal clinicamente, recorrendo, por exemplo ao IPC (Índice Periodontal Comunitário) e à PIP (Perda de Inserção Clínica), usando como base a referência European Global Oral Health Indicators Development (EGOHID) de 2008 (Bastos-Aires, Azevedo, de Lurdes Pereira, Pérez-Mongiovi, & Teixeira (2013).

A esta limitação associa-se o fato de não ter existido um grupo controlo com indivíduos saudáveis do ponto de vista periodontal e portanto, apesar de se ter conseguido uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de TNF- α em ambos os grupos, é tomado como garantido o fato de esta citocina pró-inflamatória ser um biomarcador salivar da doença periodontal. Estudos como o de Gornowicz e colaboradores (2012), Szczeklik *et al* (2012) e Desai (2014) colaboraram para esta opção. Também Sexton

Wm *et al* (2011) verificaram que o TNF- α é uma das várias citocinas que se encontra elevada na periodontite e cujos níveis diminuem com o tratamento da doença.

A artrite reumatoide e a doença periodontal são doenças inflamatórias crônicas que partilham de respostas semelhantes por parte do hospedeiro, ambas mediadas pelas mesmas citocinas inflamatórias (Zhao, Grimes, Li, Hu, & Ivashkiv, 2012; Payne, Golub, Thiele, & Mikuls, 2014).

Também o aumento da disponibilidade de alimentos de elevado teor calórico adicionado à adoção de hábitos sedentários próprios da idade levam automaticamente à maior predisposição para o desenvolvimento de doenças metabólicas como é o caso da diabetes tipo 2, assim como para a mortalidade causada por condições cardiovasculares (Vel Szic *et al.*, 2015). Níveis mais elevados de TNF- α em doentes com diabetes tipo 2 foram verificados relativamente a doentes saudáveis (Engelbretson, Chertog, Nichols, Celenti & Plasma, 2007).

Um dos critérios de exclusão que não foi considerado foi a presença da primeira causa de demência degenerativa entre a população idosa: a doença de Alzheimer (Wu & Nakanishi, 2014). Abbayya, Puthanakar, Naduwinmani & Chidambar (2015) relatam a doença de Alzheimer como uma neuroinflamação crônica persistente cuja libertação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α é também elevada, e na qual a doença periodontal se torna um risco para o aumento da severidade da condição demencial e para a sua progressão. Isso pode explicar o aumento marcado dos níveis de TNF- α no grupo geriátrico com Periodontite.

A depressão é uma condição patológica acompanhada pela alteração imunológica e pela ativação da resposta inflamatória, na qual células como os macrófagos são ativados libertando citocinas pró-inflamatórias nomeadamente TNF- α e IL-6, tendo estas sido consideradas biomarcadores de episódios depressivos e da resposta ao tratamento (Gorska-Ciebiada, Saryusz-Wolska, Borkowska, Ciebiada, & Loba, 2015).

Outra patologia que não foi considerada como fator de exclusão foi a obesidade, na qual o composto inflamatório analisado neste estudo se encontra bastante elevado a nível sistémico, devido à sua produção pelos inúmeros adipócitos que um indivíduo considerado obeso pode apresentar (Khosravi *et al.*, 2013).

A grande maioria dos idosos tende também a ter uma maior taxa de gordura corporal, havendo o risco de os valores de TNF- α serem menos precisos à medida que a idade avança, principalmente acima dos 65 anos (Pischon *et al.*, 2007).

O aumento de TNF- α no grupo dos doentes geriátricos verificado neste estudo pode por em causa a qualidade de vida destes indivíduos uma vez que está subjacente uma resposta inflamatória mais exacerbada. Este fato pode dever-se quer à existência de patologias inflamatórias que não foram excluídas, quer ao *inflammaging* característico da população geriátrica.

Relativamente à taxa de fluxo salivar não estimulado, esta apresentou-se em menor número no grupo dos indivíduos geriátricos (0,47 vs 0,48), apesar de não ser significativo ($p = 0,89 > 0,05$). Freitas Gomes e Silva (2007) concluiu que a hipossalivação estaria significativamente associada à menopausa nas mulheres que foram examinadas, com um intervalo de idades entre os 51 e os 80 anos.

A boca seca está intimamente relacionada à disfunção do paladar, o que pode muitas vezes resultar em desnutrição, uma condição frequentemente tratada e avaliada em cuidados de enfermagem em idosos (Kuriwada-satoh & Sasano, 2015).

Takeuchi *et al* (2015) relatou também que a prevalência de sensação de boca seca e redução da taxa de fluxo salivar estimulado foi significativamente maior em indivíduos mais velhos do que em indivíduos mais jovens .

As alterações da taxa de fluxo salivar são relativamente frequentes em pacientes geriátricos, e essa condição tem muitas vezes um compromisso sistémico (Preoteasa *et al.*, 2014). A redução da taxa de fluxo salivar torna-se um entrave à mastigação, à neutralização de ácidos e à proteção imunológica contra potenciais agentes patogénicos (Takeuchi *et al.*, 2015).

De uma perspetiva fisiológica, o funcionamento dos órgãos e sistemas de cada indivíduo, torna-se, com o avançar da idade, progressivamente mais lento, com menos estabilidade, coordenação e durabilidade, como é o caso da função da deglutição (Hagino, 2015).

As desordens provocadas pelo *inflammaging* , assim como a dieta e o estilo de vida revelaram uma importante complexidade de alterações epigenéticas durante a vida, e

para prevenir essas alterações associadas também a doenças multifatoriais típicas da idade é estritamente necessária a terapêutica combinada com abordagens nutricionais (Vel Szic *et al.*, 2015) com um cuidado redobrado para fornecer a indivíduos desta faixa etária a melhor qualidade de vida possível (Kinoshita, 2014).

V – Conclusão

A realização deste estudo confirma que o mediador inflamatório TNF- α se encontra bastante aumentado em indivíduos idosos com doença periodontal, comparativamente com indivíduos adultos mais novos.

A diminuição na taxa de fluxo salivar não estimulado nos indivíduos geriátricos com periodontite pode verificar-se, embora sem significância estatística.

Os resultados obtidos neste estudo realçam a importância da utilização dos mediadores inflamatórios avaliados no veículo salivar, sendo que a sua medição pode servir como meio complementar de diagnóstico uma vez que traduz, não só a existência de condições patológicas orais como de condições sistémicas.

Com o fim de proporcionar os melhores cuidados de saúde aos indivíduos geriátricos, para aumentar a esperança média de vida e melhorar a qualidade de vida de cada um, são necessários planos direcionados à prevenção, diagnóstico e manutenção baseados na singularidade de cada indivíduo tendo em conta a complexidade imunológica do hospedeiro e a biologia de cada doença.

A realização de novos estudos que tenham em conta a variável “idade” são sugeridos com o objetivo de fornecer mais precisão relativamente à complexidade do sistema imunitário do idoso e da sua resposta inflamatória. A utilização de um grupo controlo é fundamental para entender se este mediador inflamatório tem validade como marcador da resposta imunológica gerada pela doença periodontal.

VI - Bibliografia

Abbayya, K., Puthanakar, N. Y., Naduwinmani, S., & Chidambar, Y. S. (2015). Association between Periodontitis and Alzheimer's Disease. *North American Journal of Medical Sciences*, 7(6), 241–246. <http://doi.org/10.4103/1947-2714.159325>

Ahmed, B., Nanji, K., Mujeeb, R., & Patel, M. J. (2014). Effects of Polypharmacy on Adverse Drug Reactions among Geriatric Outpatients at a Tertiary Care Hospital in Karachi: A Prospective Cohort Study. *PLoS ONE*, 9(11), e112133. doi:10.1371/journal.pone.0112133

AlMoharib, H. S., AlMubarak, a., AlRowis, R., Geevarghese, a., Prethanath, R. S., & Anil, S. (2014). Oral Fluid Based Biomarkers in Periodontal Disease : Part 1 . Saliva. *Journal of International Oral Health*, 6(April), 95–103.

Andrade, P. P. De, Paraíso, D. P., Souza, E. L. de, Freitas, R. de A., & Galvão, H. C. (2007). Saliva: Métodos Atuais para Coleta e Obtenção da Amostra . Saliva: Current Methods For Collection And Attainment Of The Sample., 95–98.

Arias, J.-I., Aller, M.-A., Sánchez-Patan, F., & Arias, J. (2006). Inflammation and cancer: is trophism the link? *Surgical Oncology*, 15(4), 235–42. doi:10.1016/j.suronc.2007.02.001

Bastos-Aires D, Azevedo Á, de Lurdes Pereira M, Pérez-Mongiovi D, Teixeira A. (2013). Preliminary study of micronuclei levels in oral exfoliated cells from patients with periodontitis. *J Dent Sci*. 8(2):200–204. doi:10.1016/j.jds.2012.12.007.

Baylis, D., Bartlett, D. B., Patel, H. P., & Roberts, H. C. (2013). Understanding how we age: insights into inflammaging. *Longevity & Healthspan*, 2(1), 8. doi:10.1186/2046-2395-2-8

Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, et al. (2010) Through Ageing, and Beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians.

PLoS ONE 5(5): e10667. doi:10.1371/journal.pone.0010667

Blazkova, H., Krejčíková, K., Moudry, P., Frisan, T., Hodny, Z., & Bartek, J. (2010). Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent DNA damage and cytokine signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(1-2), 357–367. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00862.x

Boehmer, E. D., Goral, J., Faunce, D. E., & Kovacs, E. J. (2004). Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2), 342–349. doi:10.1189/jlb.0803389

Borges, I., Machado Moreira, E. A., Filho, D. W., De Oliveira, T. B., Da Silva, M. B. S., & Fröde, T. S. (2007). Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators of Inflammation* doi:10.1155/2007/45794

Brito, C. J., Carolina, A., Volp, P., Fernanda, A., Martins, C., Física, D. D. E., ... Unb, F. S. (2011). Exercício físico como fator de prevenção aos processos inflamatórios decorrentes do envelhecimento. *Escola de Nutrição, Departamento de Nutrição Clínica e Social, Universidade Federal Programa de Pós-Graduação em Educação Física, Departamento de Ciência*, 6, 544–555.

Castro C, Alves C, Lopes F. (2010) Fatores sistêmicos associados à doença periodontal em idosos. *RBCEH*;7(2):289-95.

Chopra, A., Gupta, N., Lakhanpal, M., Rao, N., & Vashisth, S. (2013). Association between obesity and periodontal disease: A cross-sectional study. *Saudi Journal of Obesity*, 1(2), 71. doi:10.4103/2347-2618.128634

Clerencia-Sierra, M., Calderón-Larrañaga, A., Martínez-Velilla, N., Vergara-Mitxelorena, I., Aldaz-Herce, P., ..., Prados-Torres, A. (2015) Multimorbidity Patterns in Hospitalized Older Patients: Associations among Chronic Diseases and Geriatric Syndromes. *PLoS ONE* 10(7): e0132909. doi: 10.1371/journal.pone.0132909

De Araújo Navas, E. A. F., Sato, E. I., Pereira, D. F. A., Back-Brito, G. N., Ishikawa, J. A., Jorge, A. O. C., ... Koga-Ito, C. Y. (2012). Oral microbial colonization in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with treatment and disease activity. *Lupus*, 21(9), 969–77. doi:10.1177/0961203312443420

Desai, G. S. (2014). Saliva as a non-invasive diagnostic tool for inflammation and insulin-resistance. *World Journal of Diabetes*, 5(6), 730. doi:10.4239/wjd.v5.i6.730

Engelbreton, S., Chertog, R., Nichols, A., Hey-Hadavi J., Celenti, R., & Grbic J. (2007). Plasma levels of tumour necrosis factor- α in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes, 18–24. *Journal of Clinical Periodontology*, 18-24. doi:10.1111/j.1600-051X.2006.01017.x

Esquenazi, D. D. a. (2008). Imunossenescência: as alterações do sistema imunológico provocadas pelo envelhecimento. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, 7(1), 38–45.

Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., ... Salvioli, S. (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(1), 92–105. doi:10.1016/j.mad.2006.11.016

Frasca D., Blomberg B. B. (2011). Aging affects human B cell responses. *J. Clin. Immunol.* 31, 430–435. doi:10.1007/s10875-010-9501-7

Frasca, D., Blomberg, BB. (2015). Inflammaging decreases adaptive and innate immune responses in mice and humans. *Biogerontology*, 2015. doi:10.1007/s10522-015-9578-8

Freitas Gomes e Silva, L. (2007). Estudo sobre o Fluxo Salivar e Xerostomia em Mulheres na Pré e Pós-Menopausa. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria E Clínica Integrada*, 7(2), 125–129. doi:10.4034/1519.0501.2007.0072.0004

Gokul K1, Faizuddin M, Pradeep AR. (2012) Estimation of the level of tumor necrosis factor- α in gingival crevicular fluid and serum in periodontal health & disease: A

biochemical study. *Indian J Dent Res.* May-Jun;23(3):348-52. doi: 10.4103/0970-9290.102221.

Golpasand Hagh, L., Zakavi, F., Hajizadeh, F., & Saleki, M. (2014). The Association Between Hyperlipidemia and Periodontal Infection. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16(12). doi:10.5812/ircmj.6577

Gornowicz, A., Bielawska, A., Bielawski, K., Grabowska, S. Z., Wójcicka, A., Zalewska, M., & Maciorkowska, E. (2012). Pro-inflammatory cytokines in saliva of adolescents with dental caries disease. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(4), 711–716.

Gorska-Ciebiada, M., Saryusz-Wolska, M., Borkowska, A., Ciebiada, M., & Loba, J. (2015). Serum Levels of Inflammatory Markers in Depressed Elderly Patients with Diabetes and Mild Cognitive Impairment. *Plos One*, 10(3), e0120433. doi:10.1371/journal.pone.0120433

Gümüş, P., Nizam, N., Lappin, D. F., & Buduneli, N. (2014). Saliva and serum levels of B-cell activating factors and tumor necrosis factor- α in patients with periodontitis. *Journal of Periodontology*, 85(2), 270–80. doi:10.1902/jop.2013.130117

Hagino, H. (2015). Effect of aging on oral and swallowing function after meal consumption, 229–235.

Jylha, M., Paavilainen, P., Lehtima, T., & Goebeler, S. (2007). Interleukin-1 Receptor Antagonist, Interleukin-6, and C-Reactive Protein as Predictors of Mortality in Nonagenarians: The Vitality 90þ Study, 62(9), 1016–1021.

Khosravi, R., Ka, K., Huang, T., Khalili, S., Nguyen, B. H., Nicolau, B., & Tran, S. D. (2013). Tumor necrosis factor- α and interleukin-6: Potential interorgan inflammatory mediators contributing to destructive periodontal disease in obesity or metabolic syndrome. *Mediators of Inflammation*, 2013. doi:10.1155/2013/728987

Kinney, J. S., Morelli, T., Braun, T., Ramseier, C. A., Herr, A. E., Sugai, J. V., ... Giannobile, W. V. (2011). Saliva/pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression. *Journal of Dental Research*, 90(6), 752–758. doi:10.1177/0022034511399908

Kinney, J. S., Ramseier, C. A., & Giannobile, W. V. (2007). Oral Fluid-Based Biomarkers of Alveolar Bone Loss in Periodontitis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098, 230–251. <http://doi.org/10.1196/annals.1384.028>

Kinoshita, D (2014). Alterações do sistema imunológico relacionadas ao envelhecimento e suas consequências. *Revista da Universidade Ibirapuera São Paulo*, v.7, p.11-19

Kuriwada-satoh, S., & Sasano, T. (2015). New Remedy for Dry Mouth Using the Gustatory-Salivary Reflex, 135(6), 783–787.

Leishman, S. J., Seymour, G. J., & Ford, P. J. (2013). Local and systemic inflammatory responses to experimentally induced gingivitis. *Disease Markers*, 35(5), 543–549. doi:10.1155/2013/948569

Mawardi, H., Elbadawi, L., & Sonis, S. (2015). Current understanding of the relationship between periodontal and systemic diseases. *Saudi Medical Journal*, 36(2), 150–158. doi:10.15537/smj.2015.2.9424

Mirrieles, J., Crofford, L. J., Lin, Y., Kryscio, R. J., Dawson, D. R., Ebersole, J. L., & Miller, C. S. (2010). Rheumatoid Arthritis and Salivary Biomarkers of Periodontal Disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(12), 1068–1074. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01625.x>

Noh, M. K., Jung, M., Kim, S. H., Lee, S. R., Park, K. H., Kim, D. H., ... Park, Y. G. (2013). Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6(3), 847–851. doi:10.3892/etm.2013.1222

Normalizado, P. O. (2011). Colheita e transporte de amostra de sangue, 2–5.

Oxford, K. L., dela Pena-Ponce, M. G. a, Jensen, K., Eberhardt, M. K., Spinner, A., Van Rompay, K. K., ... De Paris, K. (2015). The interplay between immune maturation, age, chronic viral infection and environment. *Immunity & Ageing*, 12(1), 1–20. doi:10.1186/s12979-015-0030-3

Payne, J. B., Golub, L. M., Thiele, G. M., & Mikuls, T. R. (2014). The Link Between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: A Periodontist's Perspective. *Current Oral Health Reports*, 2(1), 20–29. doi:10.1007/s40496-014-0040-9

Peres A, Nardi NB, Chies JAB. (2003) Imunossenescência: o envolvimento das Células T no Envelhecimento. *Biociências*; 11(2): 187-94.

Pischon, N., Heng, N., Bernimoulin, J.-P., Kleber, B.-M., Willich, S. N., & Pischon, T. (2007). Obesity, Inflammation, and Periodontal Disease. *Journal of Dental Research*, 86(5), 400–409. doi:10.1177/154405910708600503

Prakasam, S., & Srinivasan, M. (2014). Evaluation of salivary biomarker profiles following non-surgical management of chronic periodontitis. *Oral Diseases*, 20(2), 171–7. doi:10.1111/odi.12085

Preoteasa, E., Am, T., Iosif, L., M, M. I., Murariu-m, C., & Ct, P. (2014). Salivary changes related to systemic diseases in the edentulous patients, 7(4), 577–580.

Rajendran, M., Priyadharshini, V., & Arora, G. (2013). Is immunesenescence a contributing factor for periodontal diseases? *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(2), 169–174. <http://doi.org/10.4103/0972-124X.113064>

Rathnayake, N., Akerman, S., Klinge, B., Lundegren, N., Jansson, H., Tryselius, Y., ... Gustafsson, A. (2013b). Salivary biomarkers of oral health: a cross-sectional study. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(2), 140–7. doi:10.1111/jcpe.12038

Sexton, W. M., Lin, Y., Kryscio, R. J., Dawson, D. R., Ebersole, J. L., & Miller, C. S. (2011). Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(5), 434–41. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01706.x

Sikora E, Arendt T, Bennett M, Narita M (2011) Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev* 10:146–152. doi:10.1016/j.arr.2010.10.002

Silva, E. D. F. R., Junior, F. L. E. S., Souza, J. C., Oliveira, R. J. De, Pereira, L. C., Cordova, C. O. D. A., & Prestes, J. (2010). Imunosenescência e exercício físico. *Educação Física Em Revista*, 4(3), 1–11.

Silveira, V. R. S., Alves, A. P. N. N. (2009). Perfil celular e mediadores químicos na Doença Periodontal associada ao biofilme dental - Revisão de literatura. *R Periodontia* 2009; 19; 03: 73-9.

Stepanova, M., Rodriguez, E., Birerdinc, A., & Baranova, A. (2014). Age-independent rise of inflammatory scores may contribute to accelerated aging in multi-morbidity, 6(3).

Suvan, J., D’Aiuto, F., Moles, D. R., Petrie, A. & Donos, N. (2011) Association between over- weight/obesity and periodontitis in adults. A sys- tematic review. *Obesity Reviews* 12, e381–e404.

Szczeklik, K., Owczarek, D., Pytko-Polończyk, J., & Kęsek, B. (2012). Proinflammatory cytokines in the saliva of patients with active and non- active Crohn’s disease. *Polish Archives of Internal Medicine*, 122(5).

Takeuchi, K., Furuta, M., Takeshita, T., Shibata, Y., Shimazaki, Y., Akifusa, S., ... Yamashita, Y. (2015). Risk Factors for Reduced Salivary Flow Rate in a Japanese Population: The Hisayama Study. *BioMed Research International*, 2015, 1–7. doi:10.1155/2015/381821

Taylor, J. J. (2014). Protein biomarkers of periodontitis in saliva. *ISRN Inflammation*, 2014(Cvd), 593151. doi:10.1155/2014/593151

Tchkonia, T., Zhu, Y., van Deursen, J., Campisi, J., & Kirkland, J. L. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 966–972. doi:10.1172/JCI64098

Vallejo, A. N., C. M. Weyand, J. J. Goronzy (2004) T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends Mol. Med.* 10: 119-124

Vel Szic, K. S., Declerck, K., Vidaković, M., & Vanden Berghe, W. (2015). From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: is epigenetics the key to personalized nutrition? *Clinical Epigenetics*, 7(1), 1–18. doi:10.1186/s13148-015-0068-2

Wu, Z., & Nakanishi, H. (2014). Connection Between Periodontitis and Alzheimer ' s Disease : Possible Roles of Microglia and Leptomeningeal Cells, 13, 8–13. doi:10.1254/jphs.14R11CP

Zhao, B., Grimes, S. N., Li, S., Hu, X., & Ivashkiv, L. B. (2012). TNF-induced osteoclastogenesis and inflammatory bone resorption are inhibited by transcription factor RBP-J. *Journal of Experimental Medicine*, 209(2), 319–334. doi:10.1084/jem.20111566

VI – Anexos

FOLHA DE INFORMAÇÃO AO DOENTE

Por favor leia atentamente,

Maria Margarida Fernandes de Carvalho, aluna finalista do Mestrado Integrado em Medicina Dentária no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, vem por este meio solicitar a sua participação na realização de um trabalho de investigação no âmbito da unidade curricular de Orientação Tutorial de Projecto Final. O projecto Final tem como tema “Pesquisa na saliva de TNF α : uma relação entre doença periodontal e a idade”, sendo orientado pela Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita, docente do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

Será realizado um exame clínico onde se irá realizar os procedimentos necessários à recolha de uma amostra de saliva para medir os medidores inflamatórios de interesse, que na mesma estão presentes. Estes exames clínicos de fácil execução, indolores e não invasivos, terão uma duração aproximada de 10 minutos, na sua execução.

Os resultados obtidos serão alvo de análise estatística, sendo que os dados pessoais nunca serão revelados.

Se decidir participar ser-lhe-á entregue uma folha de consentimento informado, que deverá ler com atenção e assinar. A sua participação é voluntária, podendo desistir a qualquer momento. Serão ainda fornecidas outro tipo de informações, diretamente relacionadas com o horário de recolha de dados e com instruções prévias à mesma.

É muito importante a sua colaboração, neste estudo.

Para qualquer esclarecimento adicional, contacte o docente responsável através do seguinte n.º de telefone: 21 294 67 08 (Secretaria de docentes);

Agradeço o tempo disponibilizado na leitura deste documento.

Pela equipa de investigação

Consentimento Informado

Código | IMP:EM.PE.17_02

Monte de Caparica, ____ de ____ de 2015

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Dentária na Unidade Curricular de Orientação de Projeto Final do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, sob a orientação da Professora Doutora Fernanda de Mesquita, solicita-se autorização para a participação no meu estudo, o qual se denomina “Pesquisa de TNF-alpha: uma relação entre doença periodontal e a idade”. O estudo irá decorrer nas instalações da CES Egas Moniz, na Clínica Dentária Universitária Egas Moniz (CDUEM) e tem como objectivo de:

- A recolha de saliva de pacientes com idades compreendidas entre os 25 e os 65 anos (grupo não geriátrico) e com idade superior a 65 anos (grupo geriátrico).
- Avaliar a concentração de TNF α (componente inflamatório) na saliva em pacientes com doença periodontal, já que está descrito que se encontra aumentado nesta patologia inflamatória, e comparar esta concentração em doentes geriátricos e em não geriátricos.
- Avaliar a concentração de TNF α na saliva de doentes periodontais geriátricos. Esta análise poderá indicar se a idade tem um efeito benéfico ou prejudicial ou não tem qualquer efeito significativo no periodonto, em função da condição periodontal prévia.
- Relacionar a concentração de TNF α na saliva de pacientes geriátricos e não geriátricos com doença periodontal. Esta análise poderá indicar se existe associação e qual a importância entre o processo inflamatório envolvido na doença periodontal e o processo de envelhecimento caracterizado pela diminuição de resposta inflamatória.
- A determinação da taxa de fluxo salivar não-estimulada pertencente à amostra com o objetivo de se verificar se os doentes apresentam hipossaliva (factor de exclusão, que se entende por diminuição do fluxo salivar) e se existe diferença entre os fluxos dos grupos geriátrico e não geriátrico.

A participação neste estudo é voluntária. A sua não participação não lhe trará qualquer prejuízo.

Pensamos assim poder contribuir para o estudo do interesse científico e social, uma vez que será determinada a importância da existência de um determinado marcador inflamatório, que está anteriormente descrito como presente na doença periodontal, e em que quantidades se encontra, uma vez que este está relacionado com processos inflamatórios como é o caso da perda óssea e consequente perda de inserção periodontal. Contudo este marcador inflamatório vai-se encontrando diminuído à medida que a idade vai avançando. A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelo orientado. O Orientado está obrigado ao anonimato e confidencialidade dos sujeitos.

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelo(s) orientador(es) e/ou pelos seus mandatados. A sua recolha é anónima e confidencial.

(Riscar o que não interessa)

ACEITO/NÃO ACEITO participar neste estudo, confirmando que fui esclarecido sobre as condições do mesmo e que não tenho dúvidas.

(Assinatura do participante ou, no caso de menores, do pai/mãe ou tutor legal)



Ex.ma Senhora
Margarida Carvalho

Monte de Caparica, 17 de junho de 2015.

Ex.ma Senhora,

Venho comunicar-lhe que o Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado "Pesquisa de TNF – alfa: uma relação entre doença periodontal e idade", foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Prof.^a Doutora Maria Fernanda de Mesquita